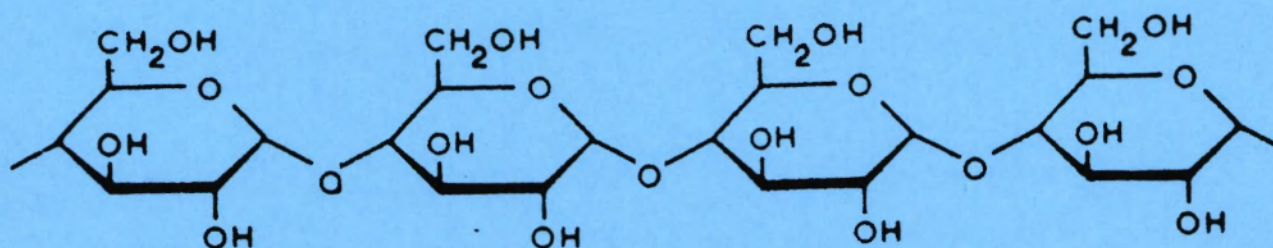


ONDER GLAS TE NAALDWIJK

Bibliotheek
Proefstation
NaaldwijkA
2.
W
80

PROEFSTATION VOOR TUINBOUW ONDER GLAS

ZETMEELBEPALING IN GEWAS

W.R. van de Woestijne
C.W. van Elderen

Naaldwijk, december 1990

Intern verslag nr. 67

224 3252

INHOUDSOPGAVE

1. Samenvatting	2
2. Inleiding	3
2.1. Aanleiding tot het onderzoek.	3
2.2. Zetmeel algemeen.	3
2.3. Literatuuronderzoek zetmeel.	3
2.4. Zetmeelbepaling in gewas.	3
3. Theorie	5
3.1. Stap 1. Het verwijderen van storende stoffen.	5
3.2. Stap 2. Het vrijmaken van het zetmeel.	5
3.3. Stap 3. De enzymatische afbraak van zetmeel naar glucose.	5
3.4. Stap 4. De enzymatische bepaling van de hoeveelheid glucose.	5
4. Onderzoek en Resultaten	7
4.1. Algemeen.	7
4.2. Onderzoek en resultaten DMSO-methode.	9
4.2.1. Invloed van de deeltjesgrootte.	9
4.2.2. Invloed van de extractie.	10
4.2.3. Invloed van de tijdsduur van de oplosstap.	11
4.2.4. Bepaling van de recovery.	12
4.3. Onderzoek en resultaten Water-methode.	13
4.3.1. Invloed van de opkookstap.	13
4.3.2. Invloed van de hoeveelheid Amyloglucosidase.	14
4.3.3. Invloed van de lengte van de incubatietijd.	15
4.3.4. Maximaal te bepalen hoeveelheid zetmeel.	16
4.3.5. Bepaling van de recovery.	17
5. Conclusies	18
6. Literatuur	19
Bijlage 1	
Bijlage 2	
Bijlage 3	

1. SAMENVATTING

Dit verslag beschrijft de ontwikkeling van een zetmeelbepaling in gedroogde gewasmonsters. Het blijkt dat het zetmeelgehalte in gewasmonsters afhankelijk is van veel verschillende factoren, zoals ras, tijdstip van bemonsteren, CO_2 -concentratie in de lucht, ouderdom van het te bemonsteren gewas, weersomstandigheden en voedingstoestand.

Er bestaan veel verschillende methodes voor de bepaling van zetmeel in gewasmonsters. De enzymatische zetmeelbepaling geeft van alle zetmeelbepalingen de meest betrouwbare resultaten, omdat de bepaling zetmeel-specifiek is. Het onderzoek spitst zich toe op deze enzymatische zetmeelbepaling. Bij deze bepaling wordt het zetmeel door het enzym amyloglucosidase afgebroken tot glucose en de hoeveelheid glucose wordt enzymatisch bepaald via de hexokinase-methode. In het algemeen is de enzymatische bepaling op te delen in de volgende vier stappen :

1. Het verwijderen van storende stoffen.
2. Het vrijmaken van het zetmeel.
3. De enzymatische afbraak van zetmeel tot glucose.
4. De enzymatische bepaling van het gevormde glucose.

Van deze enzymatische zetmeelbepaling bestaan veel varianten, in het onderzoek is gekozen voor twee ervan ; de DMSO-methode waarbij het zetmeel opgelost wordt in een DMSO/HCl-mengsel, waarna het zetmeel in 15 min enzymatisch afgebroken wordt tot glucose en de water-methode waarbij het zetmeel gegelatiseerd wordt door opkoken met water, waarna het zetmeel in 17 uur enzymatisch afgebroken wordt tot glucose. De beide methodes geven na optimalisatie overeenkomstige resultaten. Aan de hand van de verkregen resultaten zijn voor de beide methodes voorschriften opgesteld.

In de onderzochte tomatenbladmonsters, zijn zetmeelgehalten gevonden van 2 tot 5 % uitgedrukt als % zetmeel op droge stof. Omdat de water-methode eenvoudiger en gebruikersvriendelijker is, zal deze methode voortaan gebruikt worden voor de routinematige bepaling van zetmeel in gedroogde gewasmonsters.

2. INLEIDING

2.1. Aanleiding tot het onderzoek.

Het onderzoek naar de ontwikkeling van een zetmeelbepaling in gewasmonsters is, naar aanleiding van een verzoek om een dergelijke bepaling door de afdeling teelt & kasklimaat, in 1989 gestart. Wegens het ontbreken van een referentiemethode ter controle van de resultaten is na een diepgaand literatuuronderzoek het onderzoek in 1990 vervolgd, waarbij de diverse methodes met elkaar zijn vergeleken.

2.2. Zetmeel algemeen.

Zetmeel bestaat uit een mengsel van de polysacchariden amylose en amylopectine. Deze verbindingen behoren tot de groep koolhydraten. Amylose en amylopectine zijn volledig opgebouwd uit het monosaccharide D-glucose, waarbij amylose uit één rechte keten bestaat en amylopectine uit een zwak vertakte keten. Ruimtelijk gezien hebben molekulen van beide stoffen een spiraalvorm, als gevolg van de vorming van waterstofbruggen in de molekulen zelf. In het blad van een groene plant fungeert zetmeel als tijdelijke opslag van het tijdens het fotosyntheseprocess gevormde D-glucose.

2.3. Literatuuronderzoek zetmeel.

Veel literatuurgegevens over zetmeelbepalingen in bladmonsters betreffen onderzoeken met het gewas tomaat (2,10,11), vaak in combinatie met CO₂-dosering. De in deze onderzoeken vermelde zetmeelgehalten in de bladeren varieëren van 0,5 tot 23 % uitgedrukt als % zetmeel op droge stof. De hoogste percentages worden gevonden in behandelingen waar tot 5000 vpm CO₂ wordt gedoseerd.

Tevens is uit het literatuuronderzoek naar voren gekomen dat het zetmeelgehalte in bladeren afhankelijk is van een groot aantal parameters, zoals ;

- Ras (11)
- Tijdstip van bemonsteren (2,10,11)
- CO₂-concentratie in de lucht (10,11)
- Ouderdom van het te bemonsteren blad (2)
- Weersomstandigheden (2)
- Voedingstoestand van het gewas (5)

2.4. Zetmeelbepaling in gewas.

Er zijn zeer veel verschillende methodes voor de bepaling van zetmeelgehalten in gewasmonsters in gebruik (7). De twee meest voorkomende methodes zijn :

- De Anthrone-methode (10) werkt volgens het principe van zure hydrolyse van het zetmeel met perchloorzuur en daarna kleuring met Anthrone. De Anthrone-methode is geen specifieke zetmeelbepaling. Deze methode geeft, in vergelijking met de enzymatische methode, vaak te hoge zetmeelgehalten (9) (30 - 200 % te hoog) bij monsters met een relatief laag zetmeelgehalte, zoals bladmonsters. De Anthrone-methode wordt over het algemeen gebruikt voor monsters

- die een relatief hoog zetmeelgehalte bevatten, zoals granen, bonen.
- De enzymatische methode (11) werkt volgens het principe van enzymatische hydrolyse van het zetmeel tot D-glucose en daarna enzymatische bepaling van het D-glucose. Deze methode is in tegenstelling tot de Anthrone-methode wel zetmeel specifiek. Deze bepaling zal daarom de meest betrouwbare resultaten geven en om die reden spitst het onderzoek zich toe op deze bepalingmethode.

Voor een vergelijk van deze twee bepalingen zie tabel 1., waarin drie verschillende methodes voor de bepaling van zetmeel met elkaar vergeleken zijn.

Tabel 1. Vergelijking van drie methodes voor de bepaling van zetmeel.
 methode 1 = enzymatische methode
 methode 2 = iodometrische neerslag methode
 methode 3 = anthrone methode
 (tabel uit MacRae J.C., 1971, Quantitative Measurement of Starch in Very Small Amounts of Leaf Tissue.
 Planta 96 : 101 - 108)

Table 4. The starch content of leaf tissue samples measured by the enzyme method, the iodine precipitation method of Pucher *et al.* (1948) and the perchloric acid/anthrone method of Clegg (1956)

Tissue ^c	Starch content (%)		
	Enzyme method ^a	Pucher <i>et al.</i> method ^b	Clegg method ^b
Soybean (<i>Glycine max</i> [L.] Merr.)	7.44 ± 0.08 ^d	7.48 (± 0.08) ^d	10.84 (± 0.12) ^d
Clover (<i>Trifolium repens</i> L.)	5.57 ± 0.06	5.42 (± 0.10)	7.25 (± 0.21)
Ryegrass (<i>Lolium perenne</i> L.)	1.44 ± 0.08	1.57 (± 0.09)	4.43 (± 0.28)
Silverbeet (<i>Beta vulgaris</i> L.)	2.96 ± 0.04	3.07 (± 0.08)	4.89 (± 0.30)

^a Calculated using starch conversion factor 0.91.

^b Calculated using starch conversion factor 0.90.

^c For all tissue the quantities analysed were approximately 10-30 mg with the enzyme method, but approximately 200 mg with the other two methods.

^d Values in parentheses indicate the spread of duplicates; values not enclosed in brackets are standard errors of the means.

Van de enzymatische zetmeelbepaling via D-glucose bestaan veel varianten (1,2,3,4,6,7,8,9,11), maar bij alle bepalingen zijn de volgende vier stappen te onderscheiden :

1. Het verwijderen van storende stoffen.
2. Het vrijmaken van het zetmeel.
3. De enzymatische afbraak van zetmeel tot D-glucose.
4. De (enzymatische) bepaling van het gevormde D-glucose.

In het onderzoek zal voor al deze 4 stappen gezocht worden naar optimale condities.

3. THEORIE

De theorie van de enzymatische zetmeelbepaling zal aan de hand van de reeds eerder vermelde vier stappen behandeld worden.

3.1. Stap 1. Het verwijderen van storende stoffen.

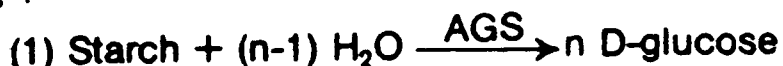
Stoffen zoals glucose, sucrose, maltose en verschillende pigmenten kunnen storen bij de bepaling van zetmeel, omdat deze stoffen bij de afbraak van zetmeel naar glucose ook omgezet worden tot glucose of omdat ze de afbraak juist tegen werken. Deze stoffen dienen daarom verwijderd te worden uit de monsters. Dit wordt over het algemeen gedaan door middel van een extractie met warme ethanol.

3.2. Stap 2. Het vrijmaken van het zetmeel.

Voordat een enzymatische omzetting van zetmeel naar D-glucose mogelijk is, moet het zetmeel vrijgemaakt worden uit de omringende matrix. De deeltjesgrootte van het gemalen monster moet daarvoor klein genoeg zijn. Tevens dient het zetmeel in een vorm gebracht te worden waarin het door het enzym amyloglucosidase (AGS) afgebroken kan worden. Het in afbreekbare vorm brengen van het zetmeel kan op verschillende manieren gebeuren. De twee meeste gebruikte methodes zijn het oplossen in DMSO (3,4,8) en het gelatiseren door middel van opkoken (1,2,6,9). Deze methodes berusten beide op het principe dat ze de waterstofbruggen die de zetmeelmolekulen in spiraalvorm houden verbreken, waardoor er lange en rechte zetmeelmolekulen ontstaan die gemakkelijk door het enzym AGS afgebroken kunnen worden.

3.3. Stap 3. De enzymatische afbraak van zetmeel naar glucose.

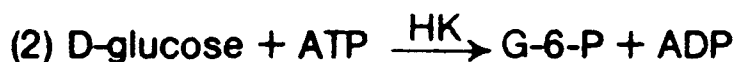
De enzymatische afbraak van zetmeel naar glucose gebeurt over het algemeen met behulp van het enzym amyloglucosidase bij een pH van 4 à 5 en een temperatuur van 55 - 60° C, volgens de reactievergelijking :



De tijd, nodig om een volledige afbraak van zetmeel tot D-glucose te bereiken, is sterk afhankelijk van de voorbehandeling en van de hoeveelheid amyloglucosidase. De afbraaktijd kan variëren van 15 min na oplossen in DMSO tot soms 48 uur na gelatiseren.

3.4. Stap 4. De enzymatische bepaling van de hoeveelheid D-glucose.

Het D-glucose kan op verschillende manieren kwantitatief bepaald worden. Het meest gebruikt is de enzymatische methode met behulp van het enzym hexokinase. Bij deze methode wordt het glucose omgezet tot glucose-6-fosfaat met behulp van het enzym hexokinase en ATP volgens de reactievergelijking :



Glucose-6-fosfaat wordt met behulp van het enzym glucose-6-fosfaat dehydrogenase en NADP geoxideerd tot gluconaat-6-fosfaat onder gelijktijdige vorming van NADPH volgens de reactievergelijking :



Uit de reactievergelijkingen valt af te leiden dat de hoeveelheid gevormd NADPH gelijk is aan de hoeveelheid glucose afkomstig van het afgebroken zetmeel. De NADPH-concentratie wordt spectrofotometrisch bepaald bij een golflengte van 340 nm. Uit deze metingen wordt de glucose concentratie van de meetoplossing berekend, waaruit weer het zetmeelgehalte van het monster berekend wordt.

4. ONDERZOEK EN RESULTATEN

4.1. Algemeen.

In het onderzoek is uitgegaan van twee verschillende enzymatische zetmeelbepalingen.

In eerste instantie is er gewerkt met de bepaling volgens Lukaszewska en Gorin (8), dit is een methode waarbij het zetmeel opgelost wordt in een DMSO/HCl mengsel. Deze methode zal in het verslag verder aangeduid worden als de DMSO-methode (voorschrift in bijlage 1).

In tweede instantie is er gewerkt met de bepaling volgens Haissig en Dickson (6), waarbij het zetmeel gegelatiseerd wordt door middel van opkoken in water. Deze methode zal in het verslag verder aangeduid worden als de water-methode (voorschrift in bijlage 2).

In beide bepalingsmethodieken zijn de eerder genoemde vier stappen van de enzymatische zetmeelbepaling terug te vinden. De methodes zijn verkort weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Schematische weergave van de in het onderzoek gebruikte methodes voor de bepaling van zetmeel.

Stap	DMSO-methode	Water-methode
1. het verwijderen van storende stoffen	ethanol-extractie	ethanol-extractie
2. het vrijmaken van het zetmeel	oplossen in DMSO/HCl mengsel	gelatiseren door opkoken met water
3. de omzetting van zetmeel naar glucose	omzetting met AGS-oplossing uit zetmeel-testkit in 15 min	omzetting met AGS-oplossing in 17 uur
4. de enzymatische bepaling van glucose	met behulp van een zetmeeltestkit	met behulp van een glucosetestkit

Bij de DMSO-methode is voor stap 3 en 4 gebruik gemaakt van de Boehringer zetmeeltestkit en bij de water-methode is bij stap 4 gebruik gemaakt van de Boehringer D-glucosetestkit.

Aan de stappen waarbij gebruik gemaakt is van een testkit is geen onderzoek verricht. Bij de overige stappen is per stap gezocht naar optimale condities. Tevens is onderzoek verricht naar de invloed van de grootte van de gemalen gewasdeeltjes op het gevonden zetmeelgehalte.

Samenvattend heeft dit geresulteerd in de volgende deelonderzoeken :

DMSO-methode : - Invloed van de deeltjesgrootte

- Invloed van de extractie
- Invloed van de tijdsduur van de oplosstap
- Bepaling van de recovery

Water-methode : - Invloed van de opkookstap

- Invloed van de hoeveelheid Amyloglucosidase
- Invloed van de lengte van de incubatietijd
- Maximaal te bepalen hoeveelheid zetmeel
- Bepaling van de recovery

Bij de watermethode is er geen onderzoek verricht naar de invloed van de deeltjesgrootte en de extractie op het gemeten zetmeelgehalte, omdat aangenomen is dat de invloed van deze parameters op het gemeten zetmeelgehalte dezelfde is als voor de DMSO-methode.

4.2. Onderzoek en resultaten DMSO-methode.

4.2.1 Invloed van de deeltjesgrootte.

Dit deel van het onderzoek betreft de monstervoorbewerking. Hierbij is onderzoek verricht naar de invloed van de deeltjesgrootte op het gehalte zetmeel. Dit is gedaan door eerst een zetmeelbepaling in het gemalen monster uit te voeren, daarna het monster te zeven en opnieuw een zetmeelbepaling uit te voeren in de fractie $< 0,1$ mm. Deze deeltjesgrootte is gekozen naar aanleiding van gegevens uit eerdere onderzoeken (6,8,9). Voor dit onderzoek is gebruik gemaakt van vijf gemalen tomatenbladmonsters. De analyses zijn uitgevoerd volgens de standaard DMSO-methode zoals die vermeld is in bijlage 1. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 3. De bepalingen zijn in duplo uitgevoerd.

Tabel 3. Invloed van de deeltjesgrootte op het gemeten zetmeelgehalte.

Monster	Percentage zetmeel	
	ongezeefd	fractie $< 0,1$ mm
8902-639	3,70	4,63
8902-640	2,41	3,57
8902-641	3,94	4,79
8902-642	3,21	4,41
8902-643	2,94	3,42
	----	----
Xgem	3,24	4,16

Uit de resultaten blijkt dat de zetmeelgehaltenes van de gezeefde monsters gemiddeld 28 % hoger liggen dan die van de ongezeefde monsters. Dit kan twee dingen betekenen ;

- Het in de grovere delen van het monster aanwezige zetmeel kan in de voorbewerking niet vrijgemaakt worden uit de omringende matrix.
- De fractie $< 0,1$ mm bevat procentueel meer zetmeel dan de grovere fracties van het monster.

Het zeven van de monsters en het bemonsteren van de fracties $< 0,1$ mm zal bij alle volgende onderzoeken steeds standaard toegepast worden. Deze fractie bestaat hoofdzakelijk uit bladmoes, de stelen en nerven van de bladeren zijn niet fijn genoeg gemalen.

4.2.2. Invloed van de extractie.

Dit deel van het onderzoek betreft stap 1 van de enzymatische zetmeelbepaling : het verwijderen van storende stoffen.

Onderzoek is verricht naar de invloed van storende stoffen op de bepaling en naar het verwijderen van deze stoffen met behulp van een extractie met 3 maal 10 ml 80 % ethanol in een ultrasoonbad bij 55 - 60° C. Naast de zetmeelbepaling is in elk monster een blanco-bepaling uitgevoerd. De zetmeelgehalten zijn eenmaal zonder en eenmaal met ethanolextractie bepaald. De absorpties van de monsters zijn gecorrigeerd met de absorpties van de monsterblanco's (bij de blanco wordt de omzetting van het zetmeel tot glucose achterwege gelaten). Voor dit onderzoek is gebruik gemaakt van 2 rozebloembladmonsters (M + S) afkomstig van het ATO en van 4 tomatenbladmonsters. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 4. De analyses zijn in enkelvoud uitgevoerd.

Tabel 4. Invloed van de extractie op het gemeten zetmeelgehalte.

Monster	Zonder extractie			Met extractie		
	Abs monster	Abs blanco	% zetmeel	Abs monster	Abs blanco	% zetmeel
M	0,390	0,148	9,92	0,282	0,008	10,62
S	0,314	0,152	10,88	0,172	0,006	12,95
8902-640	0,183	0,033	3,31	0,171	0,005	3,60
8902-641	0,279	0,047	4,99	0,243	0,008	4,68
8902-855	0,104	0,066	0,71	0,046	0,006	0,71
8902-856	0,118	0,069	0,91	0,046	0,006	0,71
* Abs reagensblanco = 0,008						

Uit de resultaten blijkt dat er hoge blanco absorpties gemeten worden zonder extractie, hetgeen wijst op de aanwezigheid van storende stoffen in het monster. Door de absorptie van het monster te corrigeren met de absorptie van de blanco, kan deze storing tot op zekere hoogte gecompenseerd worden. Dit blijkt uit de gevonden percentages zetmeel die met en zonder extractie niet veel verschillen. De absorptie van de monsterblanco na extractie is gelijk aan die van de reagensblanco. Dit houdt in dat de storende stoffen geheel verwijderd zijn. Bij de bepaling met extractie is het dan ook niet nodig om per monster een monsterblanco te bepalen, maar kan volstaan worden met een of twee reagensblanco's per serie. Bij het verdere onderzoek zal de extractie met ethanol dan ook standaard plaatsvinden en zal er niet meer per monster een monsterblanco bepaald worden, maar per serie een reagensblanco.

4.2.3. Invloed van de tijdsduur van de oplosstap.

Dit deel van het onderzoek betreft stap 2 van de enzymatische zetmeelbepaling ; het oplossen van het zetmeel met behulp van DMSO/HCl. Hierbij is uitgegaan van 30 en 60 min als duur van de oplosstap, bij 55 - 60° graden en met ultrasoon behandelen. Deze tijden worden beide in de literatuur vermeld. 30 min voor monsters waar het zetmeel gemakkelijk uit vrijgemaakt kan worden (bv. meel) en 60 min voor monsters waar het zetmeel moeilijk uit vrijgemaakt kan worden (bv. brood). Er is onderzocht of een verlenging van de oplostijd ook resulteerde in een verhoging van de gemeten zetmeel- gehalten van de monsters.

De resultaten van het onderzoek zijn vermeld in tabel 5. De bepalingen zijn in duplo uitgevoerd.

Tabel 5. Invloed van de tijdsduur van de oplosstap op het gemeten zetmeelgehalte.

Monster	Percentage zetmeel	
	na 30 min oplossen	na 60 min oplossen
8902-640	3,30	3,52
8902-641	4,45	4,71
8902-642	4,18	4,36
8902-643	3,10	3,37
	----	----
Xgem	3,76	3,99

De gemeten zetmeelgehalten zijn na 60 min oplossen een fractie hoger dan na 30 min. Een oplostijd van 60 min zal dan ook in het verdere onderzoek aangehouden worden.

4.2.4. Bepaling van de recovery.

De recovery van de DMSO-methode is bepaald door zuiver zetmeel te meten als monster. Steeds is 0,1 g zetmeel ingewogen en na oplossen verdund met buffer tot 0,5 l. Bij elke serie monsters die ingezet werden is een zetmeelstandaard meebepaald. De resultaten van deze bepalingen zijn vermeld in tabel 6.

Tabel 6. Bepaling van de recovery.

Serie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Xgem	SD
Recovery in %	78,4	79,7	77,1	73,3	75,2	78,9	73,8	75,9	75,8	76,46	2,23

Het zetmeel wordt niet volledig teruggevonden, waarschijnlijk is dit voor een groot deel te wijten aan de laatste stap van de methode, de glucosebepaling. Er zal daarom bij de monsters een correctie toegepast moeten worden. Deze correctie wordt per serie bepaald, door meting van de recovery van het monster zuiver zetmeel dat per serie meebepaald wordt.

4.3. Onderzoek en resultaten Water-methode.

4.3.1. Invloed van de opkookstap.

Dit deel van het onderzoek betreft stap 2 van de enzymatische zetmeelbepaling ; het vrijmaken van het zetmeel door opkoken met water. Hierbij is onderzocht wat voor invloed deze stap heeft op het gemeten zetmeelgehalte en of deze stap noodzakelijk is, omdat uit eerder onderzoek (6) is gebleken dat opkoken niet noodzakelijk is, mits de overmaat AGS ten opzichte van het zetmeel maar groot genoeg is.

Dit is gedaan door monsters na zeven en extraheren op drie verschillende manieren te behandelen, te weten ;

1. geen voorbehandeling
2. 30 min in ultrasoonbad bij 55-60° C
3. 30 min in ultrasoonbad bij 55-60° C en 5-10 min in kokend waterbad

Hierna werden de zetmeelgehalten bepaald volgens de Water-methode. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 7. De bepalingen zijn in duplo uitgevoerd.

Tabel 7. Invloed van de opkookstap op het gemeten zetmeelgehalte.

Monster	Percentage zetmeel		
	Behandeling 1.	Behandeling 2.	Behandeling 3.
8902-642	4,70	4,64	4,58
8902-645	4,55	4,59	4,62
8902-646	3,64	3,70	3,55
8902-650	3,51	3,37	3,65
8902-654	3,30	3,21	3,47
	----	----	----
Xgem	3,94	3,90	3,97

Uit de resultaten blijkt dat ultrasoon behandelen en opkoken nauwelijks tot geen invloed heeft op het gemeten zetmeelgehalte. Dit komt overeen met de verwachtingen. De verdere zetmeelbepalingen volgens de watermethode zijn dan ook uitgevoerd zonder ultrasoon behandelen of opkoken.

4.3.2. Invloed van de hoeveelheid Amyloglucosidase.

Dit deel van het onderzoek betreft stap 3 van de enzymatische zetmeelbepaling ; de omzetting van zetmeel naar glucose met behulp van het enzym Amyloglucosidase. Er is onderzoek verricht naar de invloed van de hoeveelheid enzym AGS op de gemeten zetmeelgehalten. Hierbij is uitgegaan van 0,83 mg AGS per mg zetmeel. Deze hoeveelheid is afgeleid uit het onderzoek van Haissig en Dickson (6). Rekening houdend met een maximum van 23 % zetmeel in een 100 mg monster, volgt daaruit dat er per monster maximaal 20 mg AGS aanwezig moet zijn. Deze hoeveelheid komt overeen met 1 ml AGS-oplossing van 20 g/l per monster. Onderzocht is of verdubbeling van de hoeveelheid AGS-oplossing van 1 naar 2 ml per monster een verhoging geeft in de gemeten zetmeelgehalten. De analyses zijn uitgevoerd volgens de standaard water-methode, zoals vermeldt in bijlage 2. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 8. De bepalingen zijn in duplo uitgevoerd.

Tabel 8. Invloed van de hoeveelheid Amyloglucosidase op het gemeten zetmeelgehalte.

Monster	Percentage zetmeel	
	1 ml AGS-oplossing	2 ml AGS-oplossing
8902-642	4,51	4,39
8902-643	3,59	3,53
8902-645	4,63	4,62
8902-646	3,74	3,45
8902-650	3,52	3,20
8902-654	3,29	3,25
	----	----
Xgem	3,88	3,74

Uit de resultaten blijkt dat een verdubbeling van de hoeveelheid AGS geen invloed heeft op de gemeten zetmeelgehalten. Er is blijkbaar met de hoeveelheid van 1 ml al een voldoende grote overmaat AGS aanwezig. De hoeveelheid AGS-oplossing van 1 ml zal daarom ook in het verdere onderzoek gehandhaafd blijven.

4.3.3. Invloed van de lengte van de incubatietijd.

Dit deel van het onderzoek betreft ook stap 3 van de enzymatische zetmeelbepaling ; de afbraak van zetmeel tot glucose met behulp van het enzym AGS. Er is onderzoek verricht naar de invloed van de lengte van de incubatietijd op de zetmeelgehalten. Er is een vergelijk gemaakt tussen 17 en 41 uur incuberen (respectievelijk 1 en 2 nachten) met 1 ml AGS-oplossing. Er is onderzocht of deze verlenging van de incubatietijd in een verhoging van de gemeten zetmeelgehalten resulteert. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 9. De bepalingen zijn in duplo uitgevoerd.

Tabel 9. Invloed van de lengte van de incubatietijd op het gemeten zetmeelgehalte.

Monster	Percentage zetmeel	
	17 uur incuberen	41 uur incuberen
8902-642	4,40	4,43
8902-643	3,40	3,23
8902-645	4,20	4,24
8902-646	3,23	3,52
8902-650	3,19	3,22
8902-654	3,15	3,17
	----	----
Xgem	3,60	3,64

Uit de resultaten blijkt dat verlenging van de incubatietijd geen significante verhoging van de gemeten zetmeelgehalten geeft, zodat in het verdere onderzoek 17 uur als incubatietijd gehandhaafd wordt.

4.3.4. Maximaal te bepalen hoeveelheid zetmeel.

Dit onderzoek betreft eveneens stap 3 van de enzymatische zetmeelbepaling ; de afbraak van zetmeel tot glucose. Hierbij is onderzoek verricht naar de door 1 ml AGS-oplossing van 20 g/l en 17 uur incuberen maximaal om te zetten hoeveelheid zetmeel. Dit is gedaan door hoeveelheden puur zetmeel variërend van 25 - 300 mg te bepalen volgens de water-methode. Bij de bepaling van het gevormde glucose is ervoor gezorgd dat de glucose-concentratie altijd binnen de bepalingssrange viel. De verwachting is dat bij een bepaalde hoeveelheid zetmeel het enzym deze hoeveelheid niet meer volledig om kan zetten, hetgeen dan te zien zal zijn aan de niet volledige recovery van het zetmeel. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld tabel 10. De bepalingen zijn in duplo uitgevoerd.

Tabel 10. Maximaal te bepalen hoeveelheid zetmeel via de water-methode.

Inweeg zetmeel in mg	Gemeten hoeveelheid zetmeel in mg	Recovery in %
25,0	24,6	98,5
50,0	49,2	98,3
75,0	74,2	99,0
100,0	100,8	100,8
150,0	149,3	99,5
200,0	197,8	98,9
300,0	302,5	100,8

Uit de resultaten blijkt dat zelfs 300 mg zetmeel nog volledig omgezet wordt door de hoeveelheid AGS. Daaruit valt op te maken dat de overmaat AGS voldoende groot is om een volledige omzetting van het in de monsters aanwezige zetmeel te realiseren.

4.3.5. Bepaling van de recovery.

Bij de zetmeelbepaling volgens de watermethode kunnen drie recovery's bepaald worden : van de totale bepaling, van de glucosebepaling en van de totale bepaling gecorrigeerd voor de recovery van de glucosebepaling. Alledrie de recovery's zijn bij elke serie monsters bepaald. De recovery van de glucosebepaling is onderdeel van de recovery van de totale bepaling. Door nu deze laatste te corrigeren voor de recovery van de glucosebepaling kan de invloed van deze bepaling op de totale bepaling bepaald worden. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 11.

Tabel 11. Bepaling van het recovery-percentages.

Serie	Recovery glucose-bepaling	Recovery zetmeel-bepaling	Gecorrigeerde recovery zetmeel- bepaling
1	87,4	84,2	96,0
2	88,0	88,3	100,7
3	92,4	89,6	94,4
4	97,4	89,2	94,9
5	87,4	85,0	96,2
6	89,4	84,7	95,8
7	85,8	79,2	90,7
8	88,8	78,8	90,3
Xgem	89,6	84,9	94,9

Uit de resultaten blijkt dat de niet volledige recovery van de hoeveelheid zetmeel voor een groot deel te wijten is aan de glucosebepaling en maar voor een klein deel aan de rest van de bepaling. Aan deze niet volledige recovery kan weinig gedaan worden. De enige oplossing is een andere glucosebepaling. Bij de huidige methode zal er een correctie voor de recovery moeten worden toegepast op de monsters.

5. CONCLUSIES

Uit het literatuuronderzoek blijkt dat voor een juiste weergave van de zetmeelgehaltes in de plant, niet de analyse maar de bemonstering van essentieel belang is. Vooral het tijdstip van bemonsteren is van grote invloed. Het bemonsteren dient te gebeuren tussen 15.00 en 16.00 uur omdat dan de zetmeelgehaltes in de bladeren het hoogst zijn. De verschillen tussen de diverse behandelingen zullen dan duidelijker aantoonbaar zijn.

Uit het eigen onderzoek is naar voren gekomen dat door zeping van het monster en bemonstering van de fijnste fractie er hogere zetmeelgehaltes gemeten worden dan in het ongezeefde monster. Er wordt dus maar in één fractie van het monster zetmeel bepaald. Een zetmeelbepaling in het totale monster kan alleen uitgevoerd worden als het gehele monster in deeltjes kleiner dan 0,1 mm gemalen wordt.

Verder blijkt uit het onderzoek dat voor beide methodes een extractie van het monster met warme ethanol noodzakelijk is om storingen van de bepaling te voorkomen.

De DMSO-methode voldoet, gezien de resultaten, goed en heeft als voordeel dat de analyse van een serie monsters in één dag afgewerkt kan worden. Als nadelen vallen aan te merken ; het feit dat de analyse erg arbeidsintensief is en het feit dat de benodigde reagentia (8 mol/l zoutzuur, 8 mol/l natronloog en DMSO) erg agressief en dus niet gebruikersvriendelijk zijn.

Ook de water-methode voldoet, gezien de resultaten goed. Deze bepaling heeft als groot voordeel dat de benodigde reagentia (Buffer pH = 4,5) niet agressief zijn. Tevens is de bepaling minder arbeidsintensief. Een nadeel is de duur van de analyse, deze ligt bij deze methode op twee dagen, dit is voornamelijk te wijten aan de incubatietijd van 17 uur.

Een nadeel van beide methodes is de niet volledige recovery van het zetmeel. Er moet daarom bij elke monsterserie een zetmeelstandaard meebepaald worden, om zo de monsters te corrigeren voor een niet volledige recovery van het zetmeel. Bij de water-methode is de enzymatische glucose-bepaling grotendeels de oorzaak van deze onvolledige recovery. Onderzocht moet worden of deze enzymatische bepaling niet vervangen kan worden door een kwantitatief nauwkeuriger glucose-bepaling, bijvoorbeeld via HPLC.

Uit het totale onderzoek valt te concluderen, dat zowel de DMSO-methode als de water-methode voor de bepaling van zetmeel in gewasmonsters geschikt zijn. Beide methodes geven goed vergelijkbare resultaten (bijlage 3). Vanwege het feit dat de water-methode minder arbeidsintensief is, maar hoofdzakelijk omdat de benodigde reagentia gebruikersvriendelijker zijn, zal deze methode voortaan gebruikt worden voor de bepaling van zetmeel in gedroogde gewasmonsters. De DMSO-methode kan eventueel als referentie-methode gebruikt worden.

6. LITERATUUR.

1. Acock B., Acock M.C. and Pasternak D., 1990.
Interactions of CO₂ enrichment and temperature on carbohydrate production and accumulation in muskmelon leaves.
J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(4) : 525 - 529.
2. Ammerlaan A.W.S., Joosten M.H.A.J. and Grange R.I., 1986.
The starch content of tomato leaves grown under glass.
Sci. Hort. 28 : 1 - 9.
3. Beutler H.O., 1978.
Enzymatische Bestimmung von Stärke in Lebensmitteln mit hilfe der hexokinase-methode.
Starch/Stärke 30 nr. 9, S 309 - 312.
4. Carpita N.C. and Kanabus J., 1987.
Extraction of starch by dimethylsulfoxide and quantitation by enzymatic assay.
Analytical Biochemistry 161 : 132 - 139.
5. Goor B.J. van, 1990.
Metabolieten die mogelijk gebruikt kunnen worden als indicatie van "verborgen" gebreken aan macro- en micro-elementen (literatuur-gegevens).
Intern verslag nr. 47, Proefstation voor Tuinbouw onder Glas te Naaldwijk.
6. Haissig B.E. and Dickson R.E., 1979.
Starch measurements in plant tissue using enzymatic hydrolysis.
Physiol. Plant. 47 : 151 - 157.
7. Holz F. 1977.
Automatische, enzymatisch-photometrische bestimmung des stärke-gehaltes von Cerealien.
Sonderdruck aus Landwirtschaftliche Forschung, Sonderheft 33/11 Kongressband 1976.
8. Lukaszewska A.J. and Gorin N., 1988.
Simplification of the Boehringer Mannheim Enzymatic Analysis of Starch in the methanol-insoluble residue of freeze-dried corollas from cut "Sonia" Roses.
Gartenbauwissenschaft 53(2) : S 49 - 51.
9. MacRae J.C., 1971.
Quantitative Measurement of starch in very small amounts of leaf tissue.
Planta 96 : 101 - 108.
10. Madsen E., 1968.
Effect of CO₂-concentration on the accumulation of starch and sugar in tomato leaves.
Physiol. Plant. 21 : 168 - 175.

11. Yelle S., Beeson R.C., Trudel M.J. and Gasselin A., 1989.
Accumulation of two tomato species to high atmospheric CO₂.
I. Sugar and Starch concentrations.
Plant. Physiol. 90 : 1465 - 1472.

BIJLAGE 1. VOORSCHRIFT DMSO-METHODE.

3.20. ZETMEELBEPALING IN GEWAS

3.20.1. Onderwerp.

Dit voorschrift beschrijft een methode voor de bepaling van het zetmeelgehalte van gedroogd gewas met behulp van enzymatische omzettingen en spectrofotometrie.

3.20.2. Toepassing.

Dit voorschrift is van toepassing op alle soorten gedroogde gewasmonsters. In het algemeen kunnen zetmeelgehaltenes vanaf 1,00 % luchtdroog gewas bepaald worden.

3.20.3. Principe.

Het gewasmonster wordt geëxtraheerd met ethanol om storende stoffen uit het monster te verwijderen. Het zetmeel wordt opgelost in een mengsel van DMSO en zoutzuur door middel van ultrasoon behandelen en verwarmen. Door toevoeging van het enzym amyloglucosidase wordt het zetmeel afgebroken tot glucose. Het glucose wordt omgezet tot glucose-6-fosfaat met behulp van het enzym hexokinase en ATP. Glucose-6-fosfaat wordt met behulp van het enzym glucose-6-fosfaat dehydrogenase en NADP geoxideerd tot gluconaat-6-fosfaat met gelijktijdige vorming van NADPH. De hoeveelheid gevormd NADPH is evenredig met de hoeveelheid glucose. De toename van het NADPH wordt spectrofotometrisch bepaald bij een golflengte van 340 nm.

3.20.4. Reagentia.

Ethanol, 80 % v/v.

- verdun 800 ml ethanol tot 1000 ml met water.

Dimethylsulfoxide (DMSO).

Zoutzuur, 8 mol/l pa.

- verdun 160 ml zoutzuur 37 % geconcentreerd tot 250 ml met water.

Natriumhydroxide-oplossing, 8 mol/l pa.

- los 80 g natriumhydroxide op in 150 ml water, laat afkoelen en vul aan tot 250 ml met water.

Bufferoplossing, pH = 4,0.

- los op in 1,5 l water : 43,0 g citroenzuur pa.
17,6 g natriumhydroxide pa.
14,6 ml zoutzuur 37 % geconcentreerd pa.
en verdun tot 2,0 l met water.

Zetmeel-testkit van Boehringer.

- Cat.no. 207 748.

geschreven door : W.R. van de Woestijne

onderwerp : zetm-XX02

versie : 1

datum : 12-10-1990

voor akkoord :

pagina : 1 van 3

3.20.5. Apparatuur.

Ultrasoonbad.

- verwarmbaar tot 55 - 60° Celcius.

Vortex mixer.

Centrifuge + 25 ml centrifugebuizen.

Vacuümpomp.

Rek met 75 ml destructiebuizen.

Cuvetten + spatels.

Stoof

- instelbaar op 55 - 60° Celcius.

Spectrofotometer en dataprocessor Hitachi 150-20.

- waarmee bij een golflengte van 340 nm de absorptie gemeten kan worden.

3.20.6. Werkwijze.

3.20.6. a. voorbehandeling monsters.

- Zeef de gedroogde en gemalen monsters.
- Weeg van de fractie < 0,1 mm 500 mg af en breng over in een 25 ml centrifugebuis.
- Weeg 100 mg zetmeel af en breng over in een 25 ml centrifugebuis.
- Voeg 10 ml warme ethanol 80 % toe, meng goed.
- Plaats de buizen in een ultrasoonbad bij 55 - 60° C. en laat 30 min staan.
- Centrifugeer 10 min bij 5000 toeren.
- Verwijder de bovenstaande vloeistof mbv vacuüm.
- Herhaal deze extractie twee maal.
- Spoel het monster over in een destructiebuis van 75 ml met 5 ml 8 mol/l zoutzuur en 4 maal 5 ml DMSO.
- Plaats het rek met de destructiebuizen in het ultrasoonbad bij 55 - 60° C. en laat 60 min staan.
- Koel het rek met de buizen af onder stromend water.
- Voeg 5 ml 8 mol/l natriumhydroxide-oplossing toe en meng goed.
- Vul de destructiebuis aan met bufferoplossing pH = 4,0 en meng goed.
- Spoel de zetmeelstandaard over in 500 ml maatkolf en vul aan met bufferoplossing pH = 4,0.
- Filtreer de monsters en gebruik het filtraat onverdund voor de bepaling.

geschreven door : W.R. van de Woestijne

onderwerp : zetm-XX02

versie : 1

datum : 12-10-1990

voor akkoord :

pagina : 2 van 3

3.20.6. b. de meetmethode.

- los de inhoud van fles nr 1 van de zetmeel testkit op in 6,0 ml water.
- los de inhoud van fles nr 2 van de zetmeel testkit op in 27,0 ml water.
- pipetteer in de cuvetten :
 - 0,100 ml oplossing nr 1
 - 0,050 ml monstermeng goed met behulp van een spateltje (laat deze na mengen in de cuvet staan) en dek de cuvetten af met parafilm. Neem twee blanco's mee.
- plaats de cuvetten in stoof bij 55 - 60° C. en laat 15 min incuberen.
- pipetteer in de cuvetten :
 - 0,500 ml oplossing nr 2
 - 0,500 ml watermeng goed met behulp van het spateltje
- volg het bedieningsvoorschrift van de spectrofotometer.
- selecteer het programma ZETMEEL.
- meet na ongeveer 3 min de absorptie van de monsters (A1).
- pipetteer in de cuvetten 0,010 ml suspensie nr 3, meng goed en meet na 15 min de absorptie van de monsters (A2).

3.20.7. Berekening.

Bepaal het absorptieverschil van de monsters en de blanco's (A2-A1).
corrigeer de de absorptie verschillen van de monsters voor
de blanco : (A2-A1)monster - (A2-A1)blanco = A-zetm

$$\% \text{ zetmeel} = \frac{\text{A-zetm} * 0,597 * V * 100}{I} * V_f * R$$

V = eindvolume monsteroplossing in l (= 0,075 of 0,500 l)
I = inweeg van het monster in g
Vf = correctiefactor voor het vochtgehalte van het monster
R = correctiefactor voor het recovery-percentages van het standaardmonster zetmeel

geschreven door : W.R. van de Woestijne	onderwerp : zetm-XX02
versie : 1	datum : 12-10-1990
voor akkoord :	pagina : 3 van 3



Starch

UV-method

for the determination of native starch¹ in foodstuffs and other materials

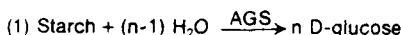
Cat. No. 207 748

Test-Combination for ca. 25 determinations

0
3
5

Principle (Ref. 1-4)

Starch is hydrolyzed to D-glucose at pH 4.6 in the presence of the enzyme amyloglucosidase (AGS) (1).



The D-glucose formed is determined with hexokinase (HK) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH) at pH 7.6. D-glucose is phosphorylated to glucose-6-phosphate (G-6-P) by adenosine-5'-triphosphate (ATP) in the presence of hexokinase with the simultaneous formation of ADP (2).



In the presence of G6P-DH glucose-6-phosphate is oxidized by nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP) to gluconate-6-phosphate with the formation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (3).



The amount of NADPH formed in the above reaction is stoichiometric with the amount of D-glucose formed by hydrolysis of the starch. NADPH is determined by means of its absorbance at 334, 340 or 365 nm.

The Test-Combination contains

1. Bottle 1 with approx. 100 mg lyophilisate, consisting of: citric acid buffer, pH 4.6; amyloglucosidase, 84 U; stabilizers.
2. Bottle 2 with approx. 5 g powder mixture, consisting of: triethanolamine buffer, pH 7.6; NADP, 75 mg; ATP, 190 mg; magnesium sulfate; stabilizers.
3. Bottle 3 with approx. 0.7 ml enzyme suspension, consisting of: hexokinase, 200 U; glucose-6-phosphate dehydrogenase, 100 U.

Preparation of solutions

1. Dissolve contents of bottle 1 with 6.0 ml redist. water.
2. Dissolve contents of bottle 2 with 27 ml redist. water.
3. Use contents of bottle 3 undiluted.

Stability of solutions

Solution 1 is stable for 6 weeks at +4°C, or for 3 months at -20°C. Bring solution 1 to 20-25°C before use.
Solution 2 is stable for 4 weeks at +4°C, or for 2 months at -20°C. Bring solution 2 to 20-25°C before use.
The contents of bottle 3 are stable for 1 year at +4°C.

Procedure

Wavelength²: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm
Glass cuvette³: 1 cm light path
Temperature: 55-60°C (incubation); 20-25°C (measurement)
Final volume: 2.32 ml
Read against air (without a cuvette in the light path) or against water.
Sample solution: 3-70 µg starch/cuvette⁴ (in 0.1-1.0 ml sample volume, or in 0.1-0.2 ml, when analyzing DMSO-containing solutions).

If the sample contains amounts of free D-glucose, a separate determination of D-glucose is necessary. In the presence of other oligosaccharides the alcohol extraction is recommended (see instruction pt. 1.2.).

- 1 Modified kinds of starch (phosphorylated or oxidized ones) do not react.
- 2 The absorption maximum of NADPH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorption maximum; when spectralline photometers equipped with a mercury vapour lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm or 334 nm.
- 3 If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.
- 4 See instructions for performance of the assay.
- 5 See instructions for sample preparation, pt. 1.2 and 1.3.
- 6 Available from Boehringer Mannheim GmbH.

Not for use in *in vitro* diagnostic procedures for clinical diagnosis.



biochemical analysis food analysis

Recommendations to methods and standardized procedures see references.

Pipette into cuvettes	reagent blank	sample	sample blank ⁵
solution 1*	0.20 ml	0.20 ml	-
sample solution**	-	0.10 ml	0.10 ml
redist. water	0.10 ml	-	-
mix*, incubate for 15 min at 55-60°C (water-bath); stopper cuvettes with the lid or with Parafilm®. Addition of			
solution 2	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
redist. water	1.00 ml	1.00 ml	1.20 ml
mix***. After approx. 3 min read absorbances of the solutions (A ₁). Start reaction by addition of			
suspension 3	0.02 ml	0.02 ml	0.02 ml
mix***, after completion of the reaction (ca. 10-15 min) read absorbances of the solutions (A ₂). If the reaction has not stopped after 15 min, read absorbances in 5 min intervals until the absorbance increases constantly over 5 min.			

* Pipette solution 1, the sample solution and redist. water, each, onto the bottom of the cuvette and mix by gentle swirling. When using a plastic spatula, remove it from the cuvette only directly before measuring absorbance A₁.

** Rinse the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution.

*** For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm® (registered trademark of the American Can Company, Greenwich, Ct, USA).

If the absorbances A₂ increase constantly extrapolate the absorbances to the time of addition of suspension 3. Determine the absorbance differences (A₂-A₁) for both reagent blank and sample. Subtract absorbance difference of the reagent blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{reagent blank}}$$

The absorbance differences measured should as a rule be at least 0.100 absorbance units to achieve sufficiently accurate results (see "Instructions for performance of assay").

Calculation

According to the general equation for calculating the concentrations:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}, \text{ where}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]
(for starch: MW_{glucose} - MW_{water} = 162.1)

d = light path [cm]

ε = absorption coefficient of NADPH at
340 nm = 6.3 [l x mmol⁻¹ x cm⁻¹]
Hg 365 nm = 3.5 [l x mmol⁻¹ x cm⁻¹]
Hg 334 nm = 6.18 [l x mmol⁻¹ x cm⁻¹]

It follows for starch:

$$c = \frac{2.32 \times 162.1}{\epsilon \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta A = \frac{3.761}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [g starch/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation the result must be multiplied by the dilution factor F.

When analyzing solid and semi-solid samples which are weighed out for sample preparation, the result is to be calculated from the amount weighed:

$$\text{content}_{\text{starch}} = \frac{c_{\text{starch}} \text{ [g/l sample solution]}}{c_{\text{sample}} \text{ [g/l sample solution]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

If the **aqueous solution** contains free D-glucose, this D-glucose is determined together with the present starch. In this case with the determination of the free D-glucose solution 1 has to be replaced by redist. water in a second assay, i.e. measurement in the absence of amyloglucosidase (sample blank). For calculation we recommend to determine the free D-glucose as glycosyl concentration (MW = 162.1) in g/l according to the above-mentioned formula. This value must be subtracted from the concentration in g/l of the first assay (measurement with solution 1, in the presence of amyloglucosidase).

Instructions for performance of assay

The starch content present in the cuvette should range between 6 µg and 70 µg (measurement at 365 nm) or 3 µg and 40 µg (measurement at 340, 334 nm), respectively. The sample solution must therefore be diluted sufficiently to yield a starch concentration between 0.06 and 0.7 g/l, or 0.03 and 0.4 g/l, respectively.

Dilution table

estimated amount of starch per liter measurements at		dilution with water	dilution factor F
340 or 334 nm	365 nm		
< 0.4 g	< 0.7 g	—	1
0.4–4.0 g	0.7–7.0 g	1 + 9	10
4.0–40 g	7.0–70 g	1 + 99	100
> 40 g	> 70 g	1 + 999	1000

If the absorbance difference measured (ΔA) is too low (e.g. < 0.100), the sample solution should be prepared anew (weigh out more sample or dilute less strongly) or the sample volume to be pipetted into the cuvette can be increased up to 1.0 ml (solution in water). The volume of water added must then be reduced so as to obtain the same final volume for the sample and blank in the cuvettes. The sample volume v must be taken into account in the calculation.

1. Instructions for sample preparation

(Starch products, flours, pastries, meat-balls and other meat products, milk products and margarine, etc.)

1.1. Solubilization

Starch or starch containing products have to be pretreated before the determination in order to convert the starch into a soluble form. Because of the simple handling solubilization with dimethylsulfoxide (DMSO) it is recommended:

Homogenize sample in a powder mill or homogenizer, and pass solid samples through a sieve of 0.2 mm pore diameter. Weigh 100 mg to 1 g of the homogenized sample accurately into a 100 ml Erlenmeyer flask, add 20 ml dimethylsulfoxide and 5 ml hydrochloric acid (8 mol/l). Concerning fat containing samples it is recommended to add first the dimethylsulfoxide whereas fat free samples or samples with a low fat content are to be treated first with hydrochloric acid. Close the Erlenmeyer flask e.g. with Parafilm[®] and incubate for 30 min (in some cases for 60 min, e.g. if bread crumbs have been used for the preparation of meat balls) at 60°C in a water-bath (shaking water-bath or heatable magnetic stirrer; care should be taken that no clotting of the sample occurs; if necessary, crush with a glass rod).

Cool quickly to room temperature, add approx. 50 ml water, and adjust to pH 4–5 with sodium hydroxide (5 mol/l) under vigorous shaking (check by pH meter). Transfer to a 100 ml volumetric flask, rinse with water, fill up to the mark with water, and filter the solution, if necessary. Use 0.1 ml (at most 0.2 ml) undiluted for the assay, immediately.

Under the aforementioned conditions, no D-glucose will be released from starch.

For simplification of the sample preparation procedure with DMSO and HCl it is recommended (ref. 13) to incubate the sample with DMSO and HCl followed by the addition of 5 ml NaOH (8 mol/l), transfer into a 100 ml volumetric flask, rinsing and filling up to the mark with citrate buffer (0.112 mol/l; pH 4). (Adjustment of the pH is not necessary in that case.)

1.2. In the presence of mono- or oligosaccharides

Sample solutions containing free D-glucose or sucrose (hydrolyzed by the DMSO/HCl pretreatment), must be determined in a second assay **without** incubation with amyloglucosidase (sample blank). Take 0.1 ml of the pretreated sample solution, add 1.2 ml water and 1.0 ml solution 2, read A_1 , then add suspension 3. Continue working as stated in the scheme.

Subtract the absorbance difference of the sample blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{sample blank}}$$

In the presence of maltose or its homologues the alcohol extraction is to be carried out, because maltose is also splitted by amyloglucosidase. Weigh approx. 400 mg of the homogenized and sieved sample accurately into a 100 ml centrifuge beaker (the water content of the sample is to be determined and should not exceed 20%, otherwise the sample has to be dried before). Wash the sample three times with 10 ml ethanol (40%, v/v) each and centrifuge. Filter the supernatant and discard the filtrate. Combine precipitate in the centrifuge beaker with the precipitate in the filter and transfer with 4 portions of 5 ml dimethylsulfoxide each into a 100 ml Erlenmeyer flask, add 5 ml HCl (8 mol/l), and continue working as stated above (see pt. 1.1). In this case, the determination of the sample blank can be neglected, but the reagent blank has to be determined.

1.3. Determination of starch-partial hydrolysates

a) Dextrins in beer

When determining dextrins in beer, the solubilization with dimethylsulfoxide can be neglected. The sample can be used directly for the assay with a volume of 0.1 ml (up to 1.0 ml, if necessary).

The dextrin concentration is calculated as starch after subtraction of possibly present free D-glucose.

b) "Glucose syrup" in fruit juices

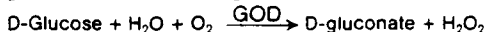
Normally, fruit juices contain a high excess of D-glucose in comparison with the concentration of glucose syrup (starch). The determination of starch is carried out directly in the sample solution according to the scheme (= starch sample) without preceding solubilization with dimethylsulfoxide. The hydrolysis of the starch sample is carried out with amyloglucosidase for 30 min at 20–25°C.

In another cuvette, D-glucose is determined **without** amyloglucosidase – as stated under 1.2. – (D-glucose sample, corresponds to the sample blank when starch is determined).

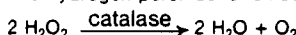
Subtract the absorbance difference $\Delta A_{\text{D-glucose sample}}$ from the absorbance difference $\Delta A_{\text{starch sample}}$:

$$\Delta A^*_{\text{glucose syrup}} = \Delta A_{\text{starch sample}} - \Delta A_{\text{D-glucose sample}}$$

If the ratio of D-glucose to glucose syrup is higher than 10:1, the precision of the determination of glucose syrup is decreased. To attain a higher precision of the measurement D-glucose present in the sample solution must be removed before the determination of glucose syrup. In the presence of the enzymes glucose oxidase (GOD) and catalase D-glucose is oxidized to D-gluconate:



The hydrogen peroxide is removed by catalase:



Reagents

Glucose oxidase (GOD), Cat. No. 105 139[®]

Catalase, Cat. No. 106 810[®]

Triethanolamine hydrochloride, Cat. No. 127 426[®]

MgSO₄ · 7 H₂O

NaOH, 4 mol/l

Preparation of solutions for 10 determinations

Enzyme solution:

Dissolve 5 mg (approx. 1250 U) GOD with 0.75 ml redist. water, add 0.25 ml catalase, and mix.

Buffer solution:

Dissolve 5.6 g triethanolamine hydrochloride and 0.1 g MgSO₄ · 7 H₂O with 80 ml water, adjust to pH 7.6 with NaOH (4 mol/l) and fill up to 100 ml with water.

Stability of solutions

The enzyme solution must be prepared freshly daily before use.

The buffer solution is stable for 4 weeks at +4°C.

Performance of D-glucose oxidation

Pipette into 10 ml volumetric flask	
buffer solution	2.0 ml
sample solution (with approx. 1% D-glucose)	5.0 ml
enzyme solution	0.1 ml
Pass a current of air (O ₂) through the mixture for 1 h; during the oxidation process check the pH with indicator paper and, if necessary, neutralize the acid formed with NaOH.	

To inactivate the enzymes GOD and catalase, place the volumetric flask in a boiling water-bath for 15 min, allow to cool, and fill up to the mark with water. Mix and filter, if necessary. Use the clear solution for the determination of the glucose syrup and the remaining D-glucose.

* Glucose syrup, calculated as starch.

c) "Starch syrup" in jam with a high sucrose content

For the determination of starch syrup besides extremely high concentrations of sucrose it is recommended to prepare the homogenized sample according to the conditions of the solubilization with dimethyl-sulfoxide.

Hereby, the present sucrose in the sample is completely hydrolyzed to D-glucose and D-fructose. The excess of D-glucose formed when using this method of sample preparation should be removed as stated under 1.3.b as to attain a higher precision of the measurement.

Use up to 5 g of the sample (jam) for the assay.

1.4. Determination of modified starch

Modified starch, e.g. phosphorylated or also oxidized starch, is only determinable in a limited amount. Amyloglucosidase hydrolyzes the modified starch up to a modification grade of 1% (if 1% of the D-glucose contained in the starch molecule is modified). The released D-glucose can be determined according to the usual method, whereas the modified glucose does not react.

Modified starch with a higher grade of modification is no more recognized by amyloglucosidase as a cleavable substrate.

2. Specificity

Amyloglucosidase hydrolyzes α -1,4- and α -1,6-glucan linkages in polysaccharides, like e.g. amylose, starch, dextrin, glycogen and also of glucosyl-oligosaccharides (maltose, maltotriose etc.).

3. Further applications

The method may also be used in the examination of paper (Ref. 10.) and in research when analyzing biological samples. For details of sampling, treatment and stability of the sample see Ref. 1 and 4.

4. Detection of interferences of the test system

When the enzymatic reaction is complete after the time given in "Procedure" it can be concluded in general that the reaction is not interfered. For assurance of results a re-start of the reaction (qualitatively or quantitatively) by the addition of 'standard material' (e.g. D-glucose) can be done: a further change of absorbance proves suitability of measurements.

For the detection of gross errors when performing the assays and of interfering substances in the sample material it is recommended to analyze a sample solution in a double determination with two different sample volumes (e.g. 0.10 ml and 0.20 ml): the measured absorbance differences have to be proportional to the sample volumes.

When analyzing solid samples it is recommended to weigh in two different amounts (e.g. 1 g and 2 g) into 100 ml volumetric flasks and to perform the determinations with the same sample volume: the absorbance differences have to be proportional to the amounts weighed in.

References

1. Keppler, D. & Decker, K. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1171-1176, Verlag Chemie, Weinheim and (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1127-1131, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, Inc. New York and London.
2. Beutler, H.-O. (1978) Enzymatische Bestimmung von Stärke in Lebensmitteln mit Hilfe der Hexokinase-Methode, *Starch/Stärke* 30, 309-312.
3. Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 2-10, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.
4. Keppler, D. & Decker, K. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 11-18, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.
5. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Stärke in Fleischerzeugnissen, 07.00/25, (Mai 1983). Bestimmung von Stärke in Wurstwaren, 08.00/26, (Mai 1983).
6. Menger, A. (1974) Anwendung enzymatischer Sorbit-, Zucker- und Stärkebestimmungsmethoden zur Lösung analytischer Probleme bei Brot und Backwaren, *Getreide Mehl Brot* 28, 36-38.
7. Meuser, F. (1972) Beckman-Report 1/72.
8. Meuser, F. & Rajani, Ch. (1976) Stärkebestimmung in Futtermitteln, *Getreide Mehl Brot* 30, 173-177.
9. Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 77, S. 11-13.
10. Untersuchung von Papieren, Kartons und Pappen für Lebensmittelverpackungen (gem. Empfehlung XXXVI der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes) Kapitel 8 (Methoden), Pkt. 3.4.1 (März 1979).
11. Bandion, F., Wurzing, A. & Neumann, K. (1986) Zum Nachweis bestimmter Stärkederivate in Wein, *Mitt. Klosterneuburg* 36, 207-209.
12. Nederlandse Norm, Onderzoekingsmethoden voor veevoeders; Bepaling van het gehalte aan zetmeel met behulp van enzymatische hydrolyse (Test methods for feeding stuffs; Determination of the starch content by enzymatic hydrolysis) NEN 3574 (Dezember 1974).
13. Lukaszewska, A. & Gorin, N. (1988) Simplification of the Boehringer Mannheim Enzymic Analysis of Starch in the Methanol-Insoluble Residue of Freeze-dried Corollas from Cut 'Sonia' Roses, *Gartenbauwissenschaft* 53, 49-51.

Further information see instructions of

Test-Combination D-Glucose	Cat. No. 716 251
Test-Combination D-Glucose/D-Fructose	Cat. No. 139 106
Test-Combination D-Glucose/D-Fructose/D-Sorbitol	Cat. No. 724 831
Test-Combination Sucrose/D-Glucose	Cat. No. 139 041
Test-Combination Sucrose/D-Glucose/D-Fructose	Cat. No. 716 260
Test-Combination D-Sorbitol/Xylitol	Cat. No. 670 057

©1989

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Biochemica

989.8 249 289 J

BIJLAGE 2. VOORSCHRIFT WATER-METHODE.

3.20. ZETMEELBEPALING IN GEWAS

3.20.1. Onderwerp.

Dit voorschrift beschrijft een methode voor de bepaling van het zetmeelgehalte van gedroogd gewas met behulp van enzymatische omzettingen en spectrofotometrie.

3.20.2. Toepassing.

Dit voorschrift is van toepassing op alle soorten gedroogde gewasmonsters. In het algemeen kunnen zetmeelgehaltenes vanaf 2,00 % luchtdroog gewas bepaald worden.

3.20.3. Principe.

Het gewasmonster wordt geëxtraheerd met ethanol om storende stoffen uit het monster te verwijderen. Door toevoeging van het enzym amyloglucosidase wordt het zetmeel afgebroken tot glucose. Het glucose wordt omgezet tot glucose-6-fosfaat met behulp van het enzym hexokinase en ATP. Glucose-6-fosfaat wordt met behulp van het enzym glucose-6-fosfaat dehydrogenase en NADP geoxideerd tot gluconaat-6-fosfaat met gelijktijdige vorming van NADPH. De hoeveelheid gevormd NADPH is evenredig met de hoeveelheid glucose. De toename van het NADPH wordt spectrofotometrisch bepaald bij een golflengte van 340 nm.

3.20.4. Reagentia.

Ethanol, 80 % v/v.

- verdun 800 ml ethanol tot 1000 ml met water.

Natriumhydroxide-oplossing, 5 mol/l pa.

- los 50 g natriumhydroxide op in 150 ml water, laat afkoelen en vul aan tot 250 ml met water.

Bufferoplossing, pH = 4,5.

- los op in 1,5 l water : 24 g citroenzuur pa.
9 g natriumhydroxide pa.
7 ml zoutzuur 37 % geconcentreerd pa.
en verdun tot 2,0 l met water, regel dan de pH af op 4,5 met 5 mol/l natriumhydroxide-oplossing.

Enzymoplossing, 20 g/l amyloglucosidase.

- los 2 g amyloglucosidase op in bufferoplossing pH = 4,5 en verdun tot 100 ml met bufferoplossing.

Glucose-testkit van Boehringer.

- Cat.no. 716 251.

geschreven door : W.R. van de Woestijne

onderwerp : zetm-XX02

versie : 1

datum : 12-10-1990

voor akkoord :

pagina : 1 van 3

3.20.5. Apparatuur.

Ultrasoonbad.

- verwarmbaar tot 55 - 60° Celcius.

Vortex mixer.

Centrifuge + 25 ml centrifugebuizen.

Vacuümpomp.

Waterbad.

Stoof.

- instelbaar op 55 - 60° Celcius.

Cuvetten + spatels.

Spectrofotometer en dataprocessor Hitachi 150-20.

- waarmee bij een golflengte van 340 nm de absorptie gemeten kan worden.

3.20.6. Werkwijze.

3.20.6. a. voorbehandeling monsters.

- Zeef de gedroogde en gemalen monsters.
- Weeg van de fractie < 0,1 mm 100 mg af en breng over in een 25 ml centrifugebuis.
- Weeg 40 mg zetmeel af en breng over in een 25 ml centrifugebuis.
- Voeg 10 ml warme ethanol 80 % toe, meng goed.
- Plaats de buizen in een ultrasoonbad bij 55 - 60° C. en laat 30 min staan.
- Centrifugeer 10 min bij 5000 toeren.
- Verwijder de bovenstaande vloeistof mbv vacuüm.
- Herhaal deze extractie twee maal.
- Voeg 2,5 ml water, 5 ml bufferoplossing pH = 4,5 en 1 ml enzymoplossing toe en meng goed.
- Plaats stoppen op de buizen.
- Zet de buizen in een stoof bij 55 - 60° C. en laat een nacht staan.
- Haal de buizen uit de stoof en laat afkoelen.
- Spoel de monsters over in 25 ml maatkolfjes en de standaarden zetmeel in 100 ml maatkolven en vul aan met water.
- Filtreer de monsters en gebruik het filtraat onverdund voor de bepaling.

geschreven door : W.R. van de Woestijne

onderwerp : zetm-XX02

versie : 1

datum : 12-10-1990

voor akkoord :

pagina : 2 van 3

3.20.6. b. de meetmethode.

- voeg aan de inhoud van fles nr 1 van de glucose testkit 45,0 ml water toe en los goed op.
 - pipetteer in de cuvetten :
 - 0,500 ml oplossing nr 1
 - 0,050 ml monster
 - 0,950 ml water
- meng goed met behulp van een spateltje (laat deze na mengen in de cuvet staan). Neem twee blanco's en twee maal een standaardoplossing glucose mee.
- volg het bedieningsvoorschrift van de spectrofotometer.
 - selecteer het programma ZETMEEL.
 - meet na ongeveer 3 min de absorptie van de monsters (A1).
 - pipetteer in de cuvetten 0,010 ml suspensie nr 2, meng goed en meet na 15 min de absorptie van de monsters (A2).

3.20.7. Berekening.

Bepaal het absorptieverschil van de monsters en de blanco's (A2-A1).
corrigeer de de absorptie verschillen van de monsters voor
de blanco : (A2-A1)monster - (A2-A1)blanco = A-gluc

$$\% \text{ zetmeel} = \frac{A\text{-gluc} * 0,8637 * V * 90}{I} * V_f * R$$

V = eindvolume monsteroplossing in l (= 0,025 of 0,1 l)
I = inweeg van het monster in g
Vf = correctiefactor voor het vochtgehalte van het monster
R = correctiefactor voor het recovery-percentages van het standaard-monster zetmeel

geschreven door : W.R. van de Woestijne onderwerp : zetm-XX02

versie : 1 datum : 12-10-1990

voor akkoord : pagina : 3 van 3



D-Glucose

UV-method

for the determination of D-glucose in foodstuffs and other materials

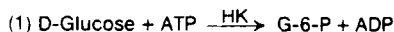
Cat. No. 716 251

Test-Combination for ca. 3 x 40 determinations

0
3
5

Principle (Ref. 1,2)

D-Glucose is phosphorylated to glucose-6-phosphate (G-6-P) in the presence of the enzyme hexokinase (HK) and adenosine-5'-triphosphate (ATP) with the simultaneous formation of adenosine-5'-diphosphate (ADP) (1).



In the presence of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH), G-6-P is oxidized by nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP) to gluconate-6-phosphate with the formation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (2).



The amount of NADPH formed in this reaction is stoichiometric with the amount of D-glucose. The increase in NADPH is measured by means of its absorbance at 334, 340 or 365 nm.

The Test-Combination contains

- Three bottles 1, each with approx. 7.2 g powder mixture, consisting of: triethanolamine buffer, pH 7.6; NADP, 110 mg; ATP, 260 mg; magnesium sulfate; stabilizers.
- Three bottles 2, each with 1.1 ml enzyme suspension, consisting of: hexokinase, 320 U; glucose-6-phosphate dehydrogenase, 160 U.
- Standard solution.

Preparation of solutions

- Dissolve contents of one bottle 1 with 45 ml redist. water.
- Use contents of one bottle 2 undiluted.

Stability of solutions

Solution 1 is stable for 4 weeks at +4°C, and for 2 months at -20°C.

Bring solution 1 to 20–25°C before use.

The contents of bottle 2 are stable for 1 year at +4°C.

Procedure

Wavelength¹: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm

Glass cuvette²: 1 cm light path

Temperature: 20–25°C

Final volume: 3.02 ml

Read against air (without a cuvette in the light path) or against water.

Sample solution: 4–100 µg D-glucose/cuvette³ (in 0.1–2.0 ml sample volume)

Pipette into cuvettes	blank	sample
solution 1	1.00 ml	1.00 ml
sample solution*	–	0.10 ml
redist. water	2.00 ml	1.90 ml
mix**, read absorbances of the solutions (A ₁) after approx. 3 min and start reaction by addition of		
suspension 2	0.02 ml	0.02 ml
mix**, wait for the end of the reaction (approx. 10–15 min), and read absorbances of the solutions (A ₂). If the reaction has not stopped after 15 min, continue to read the absorbances at 2-min intervals until the absorbances increase constantly over 2 min.***		

* Rinse the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution.

** For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm[®] (registered trademark of the American Can Company, Greenwich, Ct., USA).

*** Creep reactions occur very occasionally. They are mostly brought about by the contents of the sample solutions, such as enzymes or coloring agents. These interfering substances may be removed during sample preparation.

1 The absorption maximum of NADPH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorption maximum; when spectralline photometers equipped with a mercury vapour lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm or 334 nm.

2 If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.

3 See instructions for performance of the assay.

Not for use in *in vitro* diagnostic procedures for clinical diagnosis



biochemical analysis food analysis

Recommendations to methods and standardized procedures see references.

If the absorbances A₂ increase constantly, extrapolate the absorbances to the time of addition of suspension 2.

Determine the absorbance differences (A₂–A₁) for both blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample, thereby obtaining ΔA_{D-glucose}.

The absorbance differences measured should as a rule be at least 0.100 absorbance units to achieve sufficiently accurate results (see "Instructions for performance of assay").

Calculation

According to the general equation for calculating the concentrations:

$$c = \frac{V \times \text{MW}}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}, \text{ where}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]

d = light path [cm]

ε = absorption coefficient of NADPH at:

$$340 \text{ nm} = 6.3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3.5 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6.18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

It follows for D-glucose:

$$c = \frac{3.02 \times 180.16}{\epsilon \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta A = \frac{5.441}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [g D-glucose/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

When analyzing solid and semi-solid samples which are weighed out for sample preparation, the result is to be calculated from the amount weighed:

$$\text{content}_{\text{D-glucose}} = \frac{c_{\text{D-glucose}} \text{ [g/l sample solution]}}{c_{\text{sample}} \text{ [g/l sample solution]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

Instructions for performance of assay

The amount of D-glucose present in the cuvette should range between 8 µg and 100 µg (measurement at 365 nm) or 4 µg and 50 µg (measurement at 340, 334 nm), respectively. The sample solution must therefore be diluted sufficiently to yield a D-glucose concentration between 0.08 and 1.0 g/l or 0.04 and 0.5 g/l, respectively.

Dilution table

estimated amount of D-glucose per liter measurements at		dilution with water	dilution factor F
340 or 334 nm	365 nm		
< 0.5 g	< 1.0 g	–	1
0.5– 5.0 g	1.0–10.0 g	1 + 9	10
5.0–50.0 g	10.0–100 g	1 + 99	100
> 50 g	> 100 g	1 + 999	1000

If the absorbance difference measured (ΔA) is too low (e.g. < 0.100), the sample solution should be prepared anew (weigh out more sample or dilute less strongly) or the sample volume to be pipetted into the cuvette can be increased up to 2.0 ml. The volume of water added must then be reduced so as to obtain the same final volume for the sample and blank in the cuvettes. The new sample volume v must be taken into account in the calculation.

1. Instructions for sample preparation

1.1. Liquid foodstuffs

Dilute clear, nearly colorless solutions according to the dilution table and use them for the assay.

Neutralize strongly acid or strongly alkaline solutions which are to be used undiluted for the assay.

Decolorize strongly colored solutions, which are to be used undiluted for the assay, with polyamide (1 g/100 ml).

Degas carbonic acid containing solutions by whirling, by shaking or by filtration.

Filter turbid solutions (folded filter or membrane filter) or centrifuge and dilute the filtrate or the supernatant, respectively, according to the dilution table, if necessary.

Example:

Determination of D-glucose in milk

Pipette 20 ml milk into a 100 ml volumetric flask, add the following solutions and shake vigorously after each addition: 10 ml Carrez-I-solution (see 1.2.), 10 ml Carrez-II-solution (see 1.2.) and 20 ml sodium hydroxide (0.1 mol/l). Fill up to the mark with dist. water, mix and filter. Use 1.0 ml or 2.0 ml, respectively, of the filtrate for the assay.

1.2. Pasty and solid foodstuffs

Homogenize pasty samples, grind and homogenize solid foodstuffs. Afterwards extract with water, heated to 60°C, if necessary. Remove turbidity by filtration.

Concerning fat containing samples the fat is to be frozen in the cold (ice-bath or refrigerator) after the extraction and is then removed by filtration.

Deproteinize protein and enzyme containing samples with Carrez solutions (in the presence of sucrose, maltose or lactose deproteinization of the sample with acid – trichloroacetic acid or perchloric acid – is to be avoided because of the hydrolysis of these sugars and the release of D-glucose):

Weigh approx. 1 g sample accurately into a 100 ml volumetric flask, add approx. 60 ml water and keep at 70°C for 15 min. Shake from time to time. For protein precipitation add 5 ml Carrez-I-solution (3.60 g potassium hexacyanoferrate-II, $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O/100$ ml), 5 ml Carrez-II-solution (7.20 g zinc sulfate, $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O/100$ ml) and 10 ml NaOH (0.1 mol/l), shake vigorously after each addition, adjust to room temperature, fill up to the mark with water, and filter. Use the clear, possibly slightly turbid solution for the assay, dilute previously, if necessary.

2. Specificity

The method is specific for D-glucose.

3. Further applications

The method may also be used in the examination of cosmetics (Ref. 10), pharmaceuticals (Ref. 11), paper (Ref. 12), and tobacco (Ref. 13) and in research when analyzing biological samples. For sampling, treatment and stability of the sample see Ref. 1,2.

Examples:

3.1. Determination of D-glucose in urine and liquor (Ref. 2)

Dilute sample according to the dilution table and use the diluted sample for the assay (dilution factor = F).

Calculation:

$$c = \frac{5.441 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \text{ [g D-glucose/l sample]}$$

$$c = \frac{30.2 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \text{ [mmol D-glucose/l sample]}$$

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	$1.555 \times \Delta A \times F$	$0.8637 \times \Delta A \times F$	$0.8804 \times \Delta A \times F$
c [mmol/l]	$8.629 \times \Delta A \times F$	$4.794 \times \Delta A \times F$	$4.887 \times \Delta A \times F$

3.2. Determination of D-glucose in blood, serum and plasma (Ref. 2)

Mix 1.0 ml perchloric acid (0.33 mol/l) and 0.1 ml sample in a centrifuge tube, and centrifuge. Use the supernatant for the assay.

Further information see instructions of

Test-Combination D-Glucose/D-Fructose Cat. No. 139 106

Test-Combination D-Glucose/D-Fructose/
D-Sorbitol Cat. No. 724 831

Test-Combination Sucrose/D-Glucose Cat. No. 139 041

Test-Combination Sucrose/D-Glucose/
D-Fructose Cat. No. 716 260

Test-Combination D-Sorbitol/Xylitol Cat. No. 670 057

Test-Combination Starch Cat. No. 207 748

The dilution factor F (depending on sample preparation) is obtained from the sample volume (0.1 ml), the perchloric acid volume (1.0 ml), the specific gravity of the sample material (1.06 g/ml blood, 1.03 g/ml serum or plasma) and the fluid content (0.80 in case of blood and 0.92 in case of serum or plasma):

$$F_{\text{blood}} = \frac{0.1 \times 1.06 \times 0.80 + 1.0}{0.1} = 10.85$$

$$F_{\text{serum, plasma}} = \frac{0.1 \times 1.03 \times 0.92 + 1.0}{0.1} = 10.95$$

Calculation:

$$c = \frac{5.441 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \text{ [g D-glucose/l sample]}$$

$$c = \frac{30.2 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \text{ [mmol D-glucose/l sample]}$$

D-Glucose in blood:

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	$16.87 \times \Delta A$	$9.371 \times \Delta A$	$9.553 \times \Delta A$
c [mmol/l]	$93.62 \times \Delta A$	$52.01 \times \Delta A$	$53.02 \times \Delta A$

D-Glucose in serum or plasma:

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	$17.02 \times \Delta A$	$9.457 \times \Delta A$	$9.641 \times \Delta A$
c [mmol/l]	$94.48 \times \Delta A$	$52.49 \times \Delta A$	$53.51 \times \Delta A$

3.3. Determination of D-glucose in fermentation samples and cell culture media

Place the sample (after centrifugation, if necessary) into a water-bath at 80°C for 15 min to stop enzymatic reactions. Centrifuge and use the supernatant (diluted according to the dilution table, if necessary) for the assay. Alternatively, deproteinization can be carried out with perchloric acid, but only by absence of disaccharides, (see 1.2.) or with Carrez-solutions. See the above-mentioned examples.

Homogenize gelatinous agar media with water and treat further as described.

References

- Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) Bd. 2, 1241–1246; Verlag Chemie, Weinheim, and (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., Vol. III, pp. 1196–1201; Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, Inc., New York and London.
- Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3rd ed., vol. VI, pp. 163–172; Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.
- Deutsche Normen, Untersuchung von Stärke und Stärkeerzeugnissen: Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in derselben Untersuchungsprobe (Enzymatisches Verfahren) April 1979, DIN 10381.
- „Handbuch für diätetische Lebensmittel. Analytik – Reinheitsanforderungen – 1973“ des Bundesverbandes der diätetischen Lebensmittelindustrie e. V. Bad Homburg, herausgegeben von der Fördergesellschaft Diätetische Lebensmittel mbH.
- Bundesverband der Deutschen Feinkostindustrie e. V. Bonn, Analysenmethoden: Bestimmung des Zuckergehaltes in Tomatenmark (enzymatisch) – IV/61 (Dezember 1979).
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Glucose in Fleischwarenerzeugnissen, 07.00/22 (Mai 1983). Bestimmung von Glucose in Wurstwaren, 08.00/23 (Mai 1983). Bestimmung der belastenden Kohlenhydrate in Diätbier für Diabetiker (als Gesamtglucose), 49.01.05/1 (Mai 1984).
- Norme Française Homologuée, Jus de Fruits et Jus de Légumes: Détermination de la Teneur en Saccharose, D-Glucose, Fructose (Méthode enzymatique) NF V 76–106 (Octobre 1980).
- Schweizerisches Lebensmittelbuch (1981); Kapitel 61 B/1.1, 1.2 und 1.6.
- Gombocz, E., Heilwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau 77, 3 (Glucose).
- Henniger, G. & Boos, H. (1978) Anwendung der enzymatischen Analyse bei der Untersuchung kosmetischer Präparate – dargestellt an einigen Beispielen, Seifen – Öle – Fette – Wachse, 104, 159–164.
- Schultze, K. W. & Rummel, M. (1975) Beispiel für die Anwendung von Enzymen bei der pharmazeutischen Analyse, Acta Pharmaceutica Technologica 21, 167–170.
- Untersuchung von Papieren, Kartons und Pappen für Lebensmittelverpackungen (gem. Empf. XXXVI der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes) Kapitel 8 (Methoden), Pkt. 3.5.2 (März 1979).
- Sevali Sekin (1978) Enzymatic Determination of Glucose, Fructose and Sucrose in Tobacco, Tobacco Science 23, 75–77 bzw. Tobacco International 181, 27–29.
- Ministero dell' Agricoltura e delle Foreste (1986) Approvazione dei „Metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione“. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 161 del 14 luglio 1986.

D-Glucose standard solution

for the Test-Combination D-Glucose
UV-method, Cat. No. 716 251

Concentration*: see bottle label.

D-Glucose standard solution is a stabilized aqueous solution of D-glucose. It serves as standard solution for the enzymatic analysis of D-glucose in foodstuffs and other materials.

Application

1. Addition of D-glucose standard solution to the assay mixture:

Instead of the sample solution the standard solution is used for the assay.

2. Restart of the reaction, quantitatively:

After completion of the reaction with sample solution and measuring of A_2 , add 0.05 ml standard solution to the assay mixture. Read absorbance A_3 after the end of the reaction (approx. 15 min). Calculate the concentration from the difference of $(A_3 - A_2)$ according to the general equation for calculating the concentration. The altered total volume must be taken into account. Because of the dilution of the assay mixture by addition of the standard solution, the result differs insignificantly from the data stated on the bottle label.

* stated as anhydrous D-glucose.

©1987

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Biochemica

487.784.1.717 410 2

BIJLAGE 3. VERGELIJK RESULTATEN DMSO- EN WATER-METHODE.

Bijlage 3. : Vergelijking resultaten van de zetmeelbepalingen volgens de DMSO- en water-methode.

Monster	Percentage zetmeel	
	DMSO-methode	Water-methode
S	11,77	10,65
M	9,77	9,57
8902-642	4,39	4,52
8902-643	3,40	3,44
8902-645	4,23	4,36
8902-646	3,63	3,57
8902-650	3,15	3,28
8902-654	3,21	3,26
Xgem	5,44	5,33